

구상나무(*Abies koreana* Wilson)잎의 추출성분 및

항산화 활성

조현진, 이학주, 강하영, 최돈하, 이상극*

(국립산림과학원 화학미생물과)

1. 서 론

구상나무(*Abies koreana* Wilson)는 소나무과로서 우리나라 특산이며, 한라산, 지리산, 덕유산 등의 해발 500 ~ 2000 m 사이에 자생하는 수종으로 상록 교목이고 높이는 18 m까지 성장한다. 잎은 도피침상 선형으로 길이는 9 ~ 14 mm, 너비는 2.1 ~ 2.4 mm 정도이고, 꽃은 4 ~ 5월에 개화하며 구과는 원통형으로 자갈색이며 9 ~ 10월에 성숙한다. 구과의 빛깔에 따라 푸른구상(for. *chlorocarpa*), 검은구상(for. *nigrocarpa*), 붉은구상(for. *rubrocarpa*)으로 구분한다. 또한, 구상나무는 예로부터 주로 관상용, 가구재, 건축재 등으로 이용되어 왔다.

최근 천연물에 대한 관심과 연구가 활발해지고 있으며 수목의 추출성분을 이용하여 식품관련 산업과 의약분야에서 많은 실용화를 시도하고 있다. 그러나 수목의 약리적, 기능적 이용에는 대부분 활엽수가 이용되어 왔으며 침엽수의 이용은 매우 제한적이었다. 특히, 국내산 주요 침엽수종 잎의 추출성분에 관한 연구는 아직 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구는 국내산 주요 침엽수 잎의 추출성분들의 효율적 이용에 관한 연구 중의 하나로, 구상나무 잎의 추출성분을 분리하고 화학구조를 결정함으로써 천연물을 이용한 생리활성 보조제 및 약리적 이용에 적용하기 위한 기초 자료를 얻기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

2003년 7월 강원도 춘천시 산림개발연구원에서 자라는 생장이 양호한 구상나무의 깨끗한 잎을 채취하여 실험실에서 약 2주간 건조한 후 분쇄기를 사용하여 분말로 조제하였다.

2.2. 추출물의 조제 및 분리

기건 된 구상나무 잎 분말 2 kg을 10 l의 유리용기에 넣고 아세톤-물(7:3, v/v)의 혼합용액에 침적하여 실험실에서 약 3일간 추출하였으며, 충분한 양을 얻기 위하여 이와 같은 조작을 4회 반복 실시하여 모아진 추출액은 감압농축기를 이용하여 농축하였다.

농축된 추출물은 분획갈매기 상에서 헥산, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트를 이용하여 헥산용성, 메틸렌클로라이드용성, 에틸아세테이트용성 및 수용성분획으로 분리하고 감압농축기를 이용하여 농축하였다. 농축된 추출물들은 동결건조 하여 분말로 된 헥산용성화합물 33.57 g, 메틸렌클로라이드용성 화합물 27.28 g, 에틸아세테이트용성 화합물 50.18 g, 수용성 화합물 129.28 g, 그리고 고형분 17.54 g을 얻을 수 있었다.

2.3. 재결정법

추출액을 농축하거나 칼럼크로마토그래피를 수행하는 과정 중 결정 또는 침전물이 생기는 경우에는 순수한 결정성 화합물을 얻기 위하여 이들이 용해될 수 있는 미량의 아세톤 또는 acetone-H₂O 혼합액을 넣어 모두 완전하게 용해시킨 후 증류수를 첨가하고 침전이 형성되도록 냉장실에 일정시간 방치하였다. 이러한 조작을 3 ~ 4회 반복적으로 수행하여 몇 가지 순수한 결정성의 화합물을 얻을 수 있었다.

2.4. 추출물의 단리 및 구조규명

추출된 혼합물로부터 단일의 순수한 화합물을 분리하기 위하여 칼럼크로마토그래피를 실시하였고 충전물질로는 Sephadex LH-20을 사용하였으며 용리용매로는 메탄올 수용액을 사용하였다. 또한 칼럼으로부터 떨어지는 용출액은 fraction collector를 이용하여 순차적으로 시험관에 받았다.

단리된 물질의 확인은 셀룰로오스 박층크로마토그래피를 실시하였고 전개용매로는 6% 초산을 solvent B로, t-butanol-HOAc-H₂O (3:1:1, v/v/v)을 solvent A로 사용하였으며 발색제로는 vanillin-HCl-EtOH 용액을 분무하고 가열 건조하여 색을 관찰하였다.

단리된 화합물들의 구조는 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR, 그리고 질량분석 스펙트럼을 분석하여 정확한 구조를 규명하였다.

2.5 DPPH radical 소거법을 이용한 항산화 실험

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용한 free radical 소거능 활성을 검정하기 위하여 먼저 각 수종의 분획물들과 화합물들을 1000 ppm (10 µg/10 µl)의 농도로 만들고 methanol용액 4 ml가 들어있는 다섯 개의 시험관에 각각 0, 10, 20, 40, 80 µl씩 넣은 다음 0.15 mM의 DPPH 1 ml를 섞은 후 상온에서 30분간 반응시킨 뒤 517 nm에서 흡광도 감소를 측정하였다. 항산화 효과는 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 양(µg)을 검체의 농도(IC₅₀)로 나타내었다. 항산화력은 기존의 합성항산화제인 BHT와 천연항산화제인 α-tocopherol과 비교하면서 각 화합물 및 분획물의 IC₅₀을 구하여 항산화력이 우수한 물질을 탐색하고자 하였다.

단리된 화합물들의 농도별 IC₅₀값은 다음 식을 이용하여 계산하였다.

$$Y = AX + B$$

$$X = \text{투여량}$$

$$Y = \text{흡광도값} = (1/2) \times (\text{무첨가구의 값})$$

3. 결과 및 고찰

구상나무 잎의 ethylacetate용성 화합물 23.344 g을 유리칼럼에 주입하고 용리용매로는 먼저 MeOH-H₂O (5:1, v/v)을 사용하여 1차 분리를 실시하여 4개의 부분으로 분리하였으며 ALE로 표기하였다. 농축 후 동결 건조된 양은 ALE-1 3.40 g, ALE-2 10.68 g, ALE-3 2.83 g, ALE-4 3.81 g이었으며 ALE-3과 ALE-4 부분을 재크로마토그래피를 실시하기 위하여 MeOH-H₂O로 녹이던 중에 많은 결정이 생겨서 이것을 재결정법으로 정제하여 NMR분석을 한 결과 스틸벤 배당체인 화합물 1 (polydatin, 1.5 g)을 얻을 수 있었다. 이후 다시 ALE-3 부분을 MeOH-H₂O (2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:6, v/v)을 용리용매로 사용하여 연속적인 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 ALE-312, ALE-3212 그리고 ALE-32112에서 플라보놀 배당체인 화합물 4 (kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside, 181 mg)를 얻을 수 있었다. 다시 ALE-2부분을 MeOH-H₂O (2:1, 1:2, 1:4, 1:6, v/v)와 EtOH-hexane (4:1, v/v)을 용리용매로 사용하여 연속적인 칼럼크로마토그래피를 실시한 결과 ALE-2222에서 pyrone 계열의 화합물 5 (5-hydroxy-6-methyl-α-pyrone, 148 mg)를 분리 하였고, ALE-22322에서 플라바놀 배당체인 화합물 2 (naringenin-7-O-β-D-glucopyranoside, 106 mg)를 분리 하였으며 ALE-2232에서 플라바놀 배당체인 화합물 3 (aromadendrin-7-O-β-D-glucopyranoside, 1.5 g)을 얻을 수 있었다.

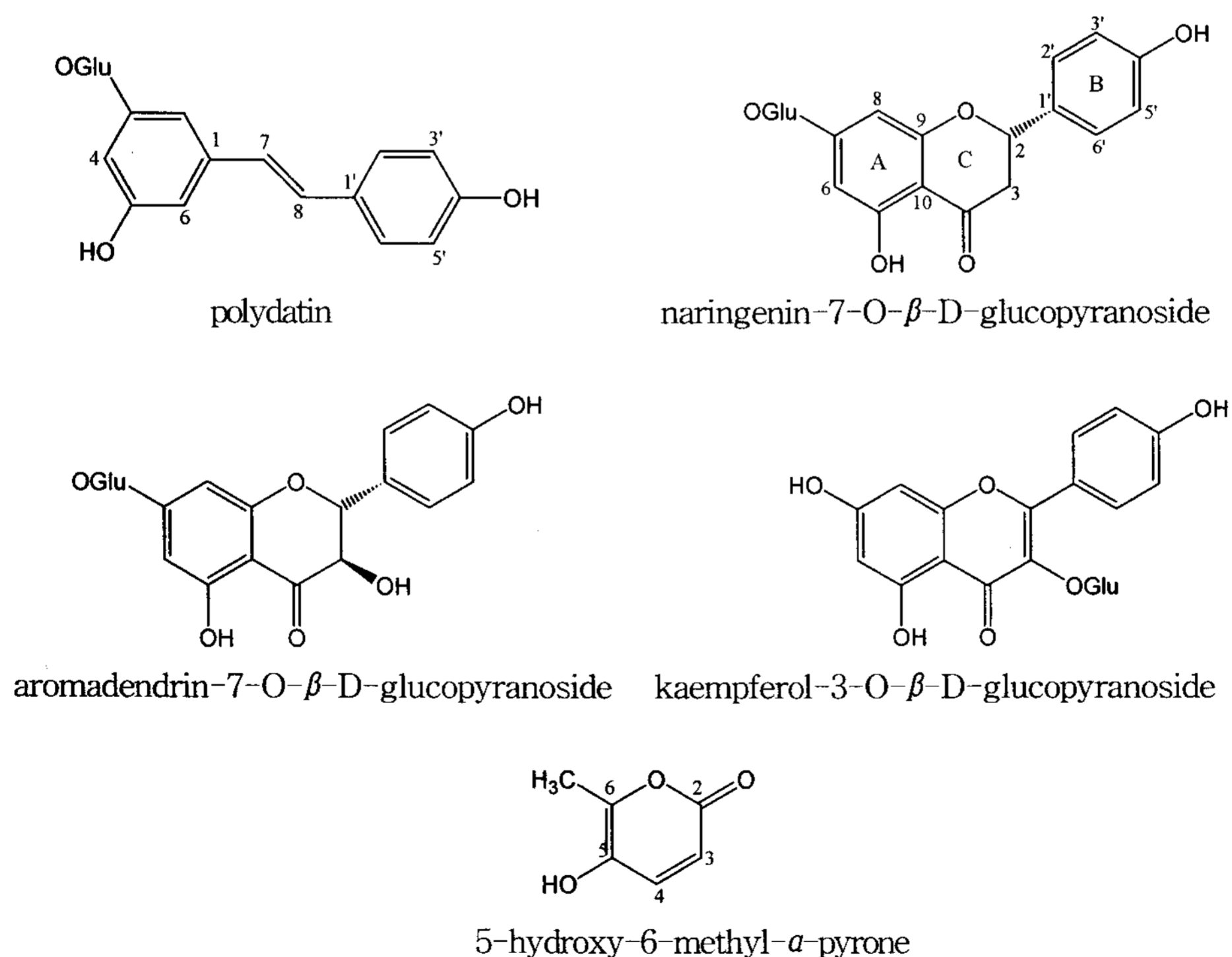


Figure 1. Structure of Isolated compounds from the needles of *A.bies koreana* Wilson.

3.1. 화합물 1 (Polydatin)

흰색의 결정성 분말로서 셀룰로오스 2D-TLC상에서 연한 적색으로 반응을 하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며 이때 R_f 값은 0.29 (solvent A)와 0.20 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for $C_{20}H_{22}O_8$ 390, Found m/z 391 $[M+H]^+$.

1H -NMR (400 MHz, δ , MeOH- d_4) : 3.33 ~ 3.49 (4H, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5''), 3.70 (1H, *dd*, $J = 5.75$ Hz, and $J = 12.01$ Hz, H-6''b), 3.92 (1H, *dd*, $J = 2.01$ Hz, and $J = 12.08$ Hz, H-6''a), 4.89 (1H, *d*, $J = 7.3$ Hz, H-1''), 6.44 (1H, *t*, $J = 2.14$ Hz, H-4), 6.61 (1H, *br s*, H-6), 6.26 (2H, *d*, $J = 8.62$ Hz, H-3', 5'), 6.78 (1H, *br s*, H-2), 6.83 (1H, *d*, $J = 16.29$ Hz, H-7), 7.00 (1H, *d*, $J = 16.27$ Hz, H-8), 7.33 (2H, *d*, $J = 8.62$ Hz, H-2', 6').

^{13}C -NMR (100 MHz, δ , MeOH- d_4) : 62.97 (C-6''), 71.86 (C-4''), 75.34 (C-2''), 78.43 (C-3''), 78.63 (C-5''), 102.78 (C-1''), 104.47 (C-4), 107.39 (C-2), 108.73 (C-6), 116.88 (C-3', 5'), 127.05 (C-7), 129.31 (C-2', 6'), 130.37 (C-8), 130.71 (C-1'), 141.82 (C-1), 158.86 (C-4'), 159.96 (C-5), 160.86 (C-3).

3.2. 화합물 2 (Naringenin-7-O- β -D-glucopyranoside)

연한 노란색의 분말로서 셀룰로오스 2D-TLC상에서 무색으로 반응을 하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며 이때 R_f 값은 0.68 (solvent A)과 0.63 (solvent B)이었다.

FAB-MS : Calculated for $C_{21}H_{22}O_{10}$ 434, Found m/z 435.24 $[M+H]^+$.

1H -NMR (400 MHz, δ , MeOH- d_4) : 2.72 (1H, *dd*, $J = 2.58$ Hz and $J = 17.08$ Hz, H-3eq), 3.11 (1H, *dd*, $J = 12.64$ Hz and $J = 17.12$ Hz, H-3ax), 3.30 ~ 4.13 (5H, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''), 4.78 (1H, *d*, $J = 9.93$ Hz, H-1''), 5.33 (1H, *d*, $J = 11.04$ Hz, H-2), 5.96 (1H, *s*, H-6), 5.96 (1H, *s*, H-8), 6.81 (2H, *d*, $J = 8.50$ Hz, H-3', 5'), 7.29 (2H, *d*, $J = 8.51$ Hz, H-2', 6').

^{13}C -NMR (100 MHz, δ , MeOH- d_4) : 43.89 (C-3), 62.93 (C-6''), 71.84 (C-4''), 75.21 (C-2''), 80.20 (C-5''), 80.48 (C-3''), 82.55 (C-2), 96.38 (C-8), 96.43 (C-6), 103.28 (C-10), 105.99 (C-1''), 116.37 (C-3', 5'), 129.08 (C-2', 6'), 130.94 (C-1'), 159.07 (C-4'), 164.25 (C-9), 164.29 (C-5), 167.32 (C-7), 198.12 (C-4).

3.3. 화합물 3 (Aromadendrin-7-O- β -D-glucopyranoside)

연한 노란색의 분말로서 셀룰로오스 2D-TLC상에서 노란색으로 반응을 하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며 이때 R_f 값은 0.43 (solvent A)과 0.72 (solvent B)였다.

FAB-MS : Calculated for $C_{21}H_{22}O_{11}$ 450, Found m/z 451.16 $[M+H]^+$.

1H -NMR (400 MHz, δ , MeOH- d_4) : 3.30 ~ 3.38 (5H, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''), 4.59 (1H, *d*, $J = 11.65$ Hz, H-3), 4.96 (1H, *d*, $J = 7.02$ Hz, H-1''), 5.01 (1H, *d*, $J = 11.76$ Hz,

H-2), 6.19 (1H, *d*, *J* = 2.12 Hz, H-6), 6.22 (1H, *d*, *J* = 2.14 Hz, H-8), 6.83 (2H, *d*, *J* = 8.44 Hz, H-3', 5'), 7.35 (2H, *d*, *J* = 8.55 Hz, H-2', 6').

¹³C-NMR (100 MHz, δ , MeOH-*d*₄) : 62.29 (C-6''), 71.11 (C-4''), 73.77 (C-3), 74.61 (C-2''), 77.75 (C-3''), 78.24 (C-5''), 85.13 (C-2), 96.99 (C-8), 98.29 (C-6), 101.27 (C-1''), 103.49 (C-10), 116.14 (C-3', 5'), 129.06 (C-1'), 130.43 (C-2', 6'), 159.28 (C-4'), 164.27 (C-9), 164.76 (C-5), 167.30 (C-7), 199.39 (C-4).

3.4. 화합물 4 (Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside)

노란색의 분말로서 셀룰로오스 2D-TLC상에서 진한 노란색으로 반응을 하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며 이때 R_f 값은 0.58 (solvent A)과 0.22 (solvent B)였다.

FAB-MS : Calculated for C₂₁H₂₀O₁₁ 448, Found m/z 449.18 [M+H]⁺.

¹H-NMR (400 MHz, δ , MeOH-*d*₄) : 3.21 ~ 3.94 (5H, *m*, H-2'', 3'', 4'', 5'', 6''), 5.24 (1H, *d*, *J* = 7.06 Hz, H-1''), 6.19 (1H, *d*, *J* = 1.08 Hz, H-6), 6.38 (1H, *br s*, H-8), 6.88 (2H, *d*, *J* = 8.57 Hz, H-3', 5'), 8.05 (2H, *d*, *J* = 8.71 Hz, H-2', 6').

¹³C-NMR (100 MHz, δ , MeOH-*d*₄) : 62.64 (C-6''), 71.37 (C-4''), 75.76 (C-2''), 78.06 (C-5''), 78.43 (C-3''), 94.85 (C-8), 100.00 (C-6), 104.16 (C-1''), 105.69 (C-10), 116.10 (C-3', 5'), 122.80 (C-1'), 132.32 (C-2', 6'), 135.49 (C-3), 158.53 (C-2), 159.09 (C-9), 161.61 (C-4'), 163.06 (C-5), 166.24 (C-7), 179.51 (C-4).

3.5. 화합물 5 (5-Hydroxy-6-methyl- α -pyrone)

흰색의 결정성 분말로서 셀룰로오스 2D-TLC상에서 무색으로 반응을 하였고, UV램프 하에서는 갈색으로 나타났으며 이때 R_f 값은 0.85 (solvent A)와 0.80 (solvent B)이었다.

EI-MS : Calculated for C₆H₆O₃ 126, Found m/z 126 [M]⁺.

¹H-NMR (400 MHz, δ , MeOH-*d*₄) : 2.33 (3H, *s*, H-Me), 6.38 (1H, *d*, *J* = 5.5 1Hz, H-3), 7.93 (1H, *d*, *J* = 5.51 Hz, H-4).

¹³C-NMR (100 MHz, δ , MeOH-*d*₄) : 14.62 (C-Me), 114.78 (C-3), 144.94 (C-6), 152.61 (C-5), 156.67 (C-4), 175.64 (C-2).

3.6. DPPH 라디칼 소거능을 이용한 항산화 시험

구상나무 잎의 각 분획물들과 분리된 화합물들을 가지고 DPPH radical 소거법을 이용하여 기초적인 항산화 실험을 실시하였다. 기준물질로는 기존의 합성 항산화제인 BHT와 천연 항산화제인 α -tocopherol을 사용하여 항산화 활성을 비교하였다.

Table 1에서 보는바와 같이 각 분획물들 중에서 조추출물은 활성이 없었으며 수용성과 CH₂Cl₂ 용성에서만 어느 정도의 활성을 나타내었다. 분리된 화합물들 중에는 polydatin에서만 활성을 나타내었으며 나머지 화합물들은 활성이 없는 것으로 나타났다.

Table 1. Antioxidation activities of the fractionated extractives and isolated compounds from the needles of *Abies koreana* Wilson

	Sample	IC ₅₀ (μ g)
Control	BHT	12 μ g
	<i>α</i> -tocopherol	14 μ g
Crude and fractionated extractives	Crude extractive	-
	Hexane soluble fraction	45 μ g
	CH ₂ Cl ₂ soluble fraction	38 μ g
	EtOAc soluble fraction	42 μ g
	H ₂ O soluble fraction	32 μ g
Isolated compounds	Polydatin	34 μ g
	Naringenin-7-O- β -D-glucopyranoside	-
	Aromadendrin-7-O- β -D-glucopyranoside	-
	Kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside	-
	5-Hydroxy-6-methyl- α -pyrone	-

4. 결 론

구상나무 잎의 에틸아세테이트 가용부를 sephadex LH-20으로 충전한 칼럼크로마토그래피를 실시하여 스티벤 계열의 polydatin(1.5 g), 플라바논 계열의 naringenin-7-O- β -D-glucopyranoside (106 mg), 플라바노놀 계열의 aromadendrin-7-O- β -D-glucopyranoside (1.5 g), 플라보놀 계열의 kaempferol-3-O- β -D-glucopyranoside (181 mg), pyron 계열의 5-hydroxy-6-methyl- α -pyrone (148 mg)과 같은 비교적 다양한 종류의 화합물을 분리 하였다. polydatin과 aromadendrin 배당체는 주로 결정형태로 분리가 되었으며 분리 된 양으로 보아 구상나무 잎의 주성분으로 생각되어진다. DPPH radical 소거법을 이용한 항산화 실험에서 분획물 중에는 CH₂Cl₂ 용성과 H₂O 용성에서, 그리고 분리 된 화합물 중에는 polydatin에서 항산화 효능을 나타내었다.